

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460880

研究課題名(和文)新規薬物精製用シリカモノリスの開発と法医鑑定試料からの系統的一斉抽出法の研究

研究課題名(英文) Development of monolithic silica for solid phase extraction and simultaneous extraction of drugs in forensic samples by using its monolithic silica

研究代表者

奈女良 昭 (Namera, Akira)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・准教授

研究者番号：30284186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：MonoSpinカラムを使用した全血中からの薬物抽出の簡素化を目的に、スルーポア(通過孔)とメソポア(細孔)の大きさを变化させた全血用のモノリスカラムを作成して種々の特性の検証を加えた。全血を5倍希釈して1000rpmで2分間遠心分離することで薬物の吸着を行った。定量範囲を検討した結果、概ね2000ng/mLまで直線性($r>0.992$)が得られ、検出下限は0.5ng/mL(一部10ng/mL)であった。また、再現性も確認できた。本方法は、濃縮操作を必要としないため前処理時間が短縮でき、遠心分離器を使用した簡便な操作のため人為的な誤差の抑制が可能となると期待される。

研究成果の概要(英文)：The optimal monolithic silica in MonoSpin C18 for solid-phase extraction of drugs from whole blood samples was developed to facilitate high-throughput analysis. The silica monolith of 20 μm through-pore size, 10.4 nm mesopore size, and 17.3% carbon content achieved the best recovery of the target analytes in whole blood samples. The extraction proceeded with centrifugal force via centrifuging at 1000 rpm for 2 min, and the eluate was directly injected into the liquid chromatography - mass spectrometry system without any tedious steps such as evaporation of extraction solvents. Under optimized condition, low detection limits of 0.5 ng/mL and calibration ranges up to 2000 ng/mL were obtained. The results indicate that the developed method based on the use of monolithic silica has the advantages of convenience and high efficiency, and can be successfully applied to detect drugs in whole blood samples.

研究分野：法医中毒学

キーワード：分析化学 薬物分析 前処理 法医学 中毒

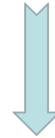
1. 研究開始当初の背景

近年の急激な生活・社会習慣の変化を背景に多種多様な薬物へのリスクが高まっている。高齢化社会が成熟するに当たり、循環器障害や中枢神経障害に対する治療薬の処方が激増する反面、インターネットを介した新規薬物(脱法ドラッグなど)や国内未承認医薬品の簡便な入手により、誤用や多量摂取による副作用や過剰作用などが大きな社会問題となるなど、以前にも増して多種多様な薬物の死因への関与が危惧されている。行政や学会レベルで「死因究明のあり方について」の検討も行われているが、社会生活の変化を鑑み、死因究明には麻薬や覚せい剤類などの法律で規制されている薬物と同時に中枢神経作用薬や循環器治療薬など、想定外の薬物の検査が要求されるようになってきている。しかし、救急や法医学の薬物検査で汎用されている薬物検査キットは、1) 法律で規制されている薬物を検査対象としている、2) 乱用されている薬物のトレンドには追いつかない、などの種々の問題点を抱えており、多くの薬物を見逃している危険性は否めない。

近年、法医学分野においても質量分析計が汎用検出器として利用され始めているが、検査試料中の妨害成分の除去などの理由で試料そのままを検出器に導入できないため、薬物の精製や濃縮に莫大な時間と労力を掛けている。また、既存の抽出製品(固相カラムなど)でも精製や濃縮は可能であるが、目詰まりを起こすなど、唯一無二の貴重で限られた量の試料を台無しにする危険性が高い。さらに、法医学では、分析に携わる人材が不足しており、分析の専門家でなく誰が行っても同じ結果の出る精度の高い前処理法・分析法が求められている。

使い捨ての基剤の使用
汎用の遠心分離器の使用
(ボタンを押すだけ!!)

- 専門の技術が不要
(誰が行っても同じ結果になる)
- 失敗がない
- 処理時間の劇的短縮



技術的・経済的波及効果

- 施設間誤差が無く、再現性の高い方法
- 環境、食品分野など他分野での応用も可
- 開発途上国での検査に活用

固相抽出の概念を変える
新規市場開拓 など

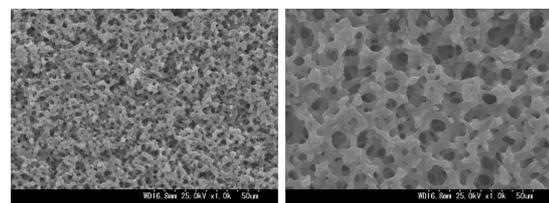
3. 研究の方法

本研究では、(1)血液使用に最適なシリカモノリスの開発、(2)酸性、中性、塩基性薬物と各種官能基の相互作用の基礎検討、(3)一斉抽出を可能とする官能基の検討、(4)開発したスピンカラムを用いた系統的一斉薬物分析法の構築を行い、法医鑑定や救急医療現場で得られた血液に適用して、その有用性を評価する。

4. 研究成果

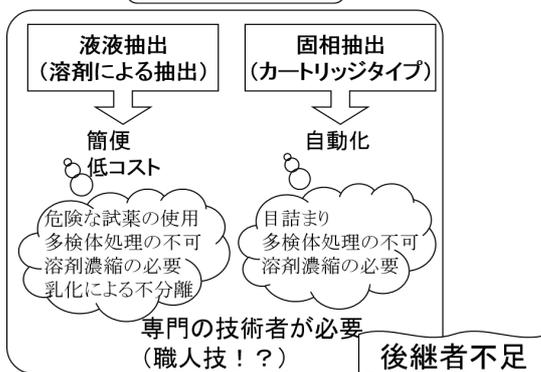
(1)血液使用に最適なシリカモノリスの開発
血液用シリカモノリスの骨格径と細孔径、表面加工の検討：

市販の空隙径は 5 μm で血液試料は目詰まりしたため、20 μm に拡大した結果、目詰まりは解消できた。また、空隙径拡大に伴う薬物抽出効率の低下を補足するため、3種類の細孔径(10, 14, 28nm)のカラムを作成した。さらに、各細孔径のカラム表面に塗布する炭素(オクタデシル基; C18)の割合を変化させたカラム2種類、合計6種類のカラムを作成した。



抽出に適した血液希釈割合の検討：
血液を緩衝液で1~10倍に希釈して通過度

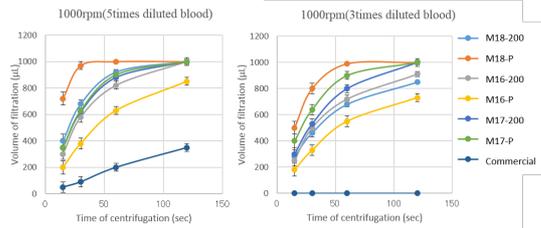
これまでの手法



2. 研究の目的

本研究では、専門技術者の不足している法医学分野においても、失敗することなく、効率的な薬物検査を行うことを目的に、(1)簡便で誰が行っても同じ結果の出る、(2)分析精度の低下を起こさない、(3)少量の試料から失敗無く検査できる方法を開発する。

合いを検証した結果、1倍では通過しなかったが、5倍以上希釈することで完全に通過することが確認できた。また、細孔径が小さいほど通過しづらい傾向が認められ、血液の粘度が影響していると考えられた。

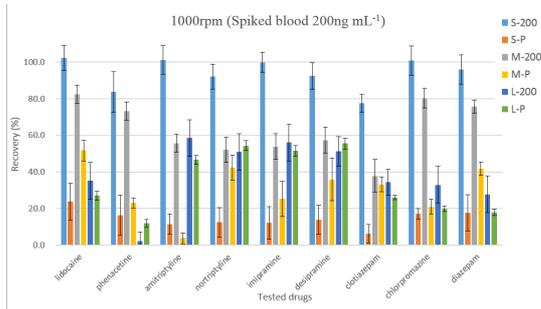


血液用スピнкаラムに適した流速の検討：薬物抽出の効率は、シリカモノリスとの接触速度（カラム中の流速）に依存する。スピнкаラム中の流速は、遠心分離器は回転速度に依存するため、この回転速度コントロールして最適条件を検討した。今回は、塩基性および中世薬物9種を用いて検討した。その結果、薬物の回収率は回転数と細孔径に反比例して回収率の上昇することが確認できた。本検討の結果、血液は5倍希釈し、骨格径10μm・細孔径10nmのカラムを用いて1000rpmで2分間の抽出が最適条件となった。

(2) 酸性、中性、塩基性薬物と各種官能基の相互作用の基礎検討

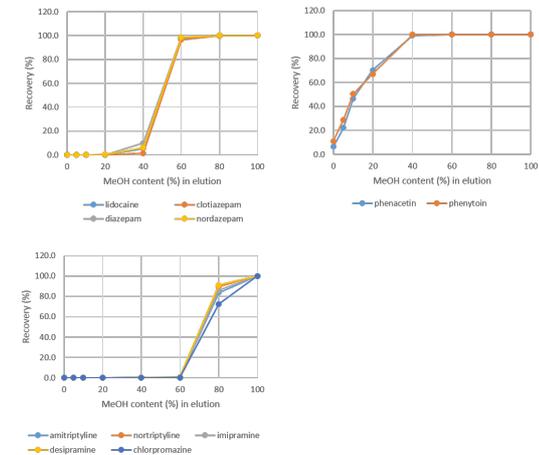
オクタデシル基（C18）やイオン交換基（SAX, SCX）での塩基性薬物（覚せい剤、モルヒネ系麻薬、カチノン系薬物、拮抗薬など）、酸性・中性薬物（バルビツール酸類など）の吸着特性や選択性向上を検討した。

その結果、塩基性薬物はアルカリ性下において、酸性薬物は酸性下においてC18で吸着可能であった。吸着（抽出）率は80%以上であり、急性中毒が疑われる血中濃度範囲において直線性が確認でき、再現性（定量性）にも優れていた。



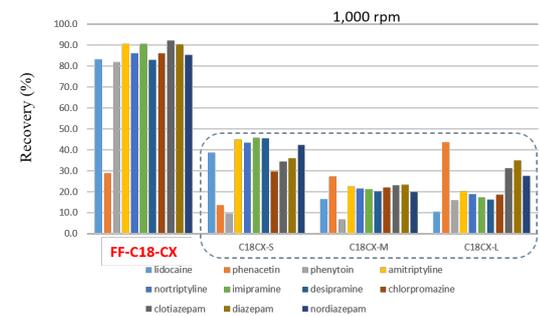
しかし中性薬物において、アルカリ性および酸性下においては、その抽出率は各々の薬物の油水分配係数の影響を受けていることが示唆され、油水分配係数の小さい薬物の抽出率は低くなった。また、内因性の妨害物質を序曲する目的で、薬物の保持などを詳細に検

討した結果、薬物の保持はlogP値の影響を受け、洗浄溶媒にメタノールを加えることで溶出されてしまった。



(3) 一斉抽出を可能とする官能基の検討

血液中からの系統的一斉抽出を目的に複数の官能基を塗布したC18-SCXおよびC18-SAXで検討したが、C18-SAXでの通液性の悪さから、C18-SCXを用いることとした。さらに、モノリスシリカの最適通過孔についても再検討したが、通過孔が大きさに比例して血液の通液性が良くなったものの薬物の回収率は低く抑えられた。また、モノリスシリカ表面積および表面のC18やSCX塗布量についても検討した。薬物の回収率は表面積の増加とともに増加したが、C18やSCX含量が増えるに従い薬物の回収率は低下した。C18-SCXを用いて構築できた系統的一斉抽出条件を使用し、各種薬物の良好な定量性、再現性が確認できた。



(4) 開発したスピнкаラムを用いた系統的一斉薬物分析法の構築

薬物の保持などを詳細に検討した結果、薬物の保持はlogP値の影響を受け、洗浄溶媒にメタノールを加えることで溶出されてしまった。定量範囲を検討した結果、概ね2000ng/mLまで直線性（ $r > 0.992$ ）が得られ、検出下限は0.5ng/mL（一部10ng/mL）であった。また、5.0, 50, 500, 1500ng/mL添加時

のばらつきを検討した結果、日内および経日間のばらつきは15%以内となり、再現性も確認できた。

Drug	logP	pKa	Detection limit (ng/ml)	Range of linearity (ng/ml)	Linearity*	Correlation coefficient
Lidocaine	2.44	8.01	0.5	2.0-2000	y = 0.0022x + 0.0043	0.999
Phenacetin	1.58	2.20	2.0	5.0-2000	y = 0.0003x + 0.0025	0.989
Amiripryline	4.92	9.40	0.5	1.0-2000	y = 0.0026x - 0.0106	0.999
Nortriptyline	4.51	10.1	0.5	1.0-2000	y = 0.0020x - 0.0001	0.999
Imipramine	4.81	9.40	0.5	1.0-2000	y = 0.0021x - 0.0028	0.999
Desipramine	4.90	10.4	0.5	1.0-2000	y = 0.0012x + 0.0074	0.999
Clozapepam	3.58	2.39	0.5	1.0-2000	y = 0.0021x - 0.0185	0.999
Chlormepazine	5.41	9.20	0.5	1.0-2000	y = 0.0016x - 0.0256	0.996
Diazepam	2.63	2.92	0.5	2.0-2000	y = 0.0021x + 0.0028	0.999
Nordiazepam	2.90	3.50	0.5	2.0-2000	y = 0.0012x + 0.0405	0.992
Loxoprofen	3.25	4.20	1.0	2.0-2000	y = 0.0012x + 0.0328	0.995
Ketoprofen	3.12	4.55	0.5	1.0-2000	y = 0.0019x + 0.0001	0.999
Naproxen	3.18	4.39	10	10-2000	y = 0.0003x - 0.0004	0.999

* x is the concentration of the target drug (ng/ml), and y is the peak area ratio.

Name (ng/mL)	Recovery (%)	Matrix effect (%)	Intraday		Interday		Name (ng/mL)	Recovery (%)	Matrix effect (%)	Intraday		Interday	
			Accuracy (%)	RSD (%)	Accuracy (%)	RSD (%)				Accuracy (%)	RSD (%)	Accuracy (%)	RSD (%)
Lidocaine	-	-	101.8	11.3	101.5	11.8	Chlormepazine	-	-	97.9	10.9	91.9	12.4
50	-	-	101.1	8.1	101.5	11.1	50	-	-	101.2	9.2	91.1	12.2
100	80.2	63.3	101.9	1.1	100.9	0.5	100	86.3	88.9	100.7	4.3	96.5	3.2
500	-	-	101.4	2.0	100.5	0.7	500	-	-	100.1	1.4	99.8	1.2
Phenacetin	-	-	95.9	5.4	108.4	14.9	Chlormepazine	-	-	96.6	7.4	102.5	7.2
50	-	-	112.0	10.1	102.8	13.3	50	-	-	100.4	1.4	104.4	3.0
100	19.6	61.6	100.1	12.6	101.6	12.4	100	98.0	54.5	100.7	4.5	99.6	14.2
500	-	-	100.8	3.6	101.4	1.2	500	-	-	100.1	0.9	100.6	14.2
Amiripryline	-	-	95.9	3.9	96.1	0.9	Diazepam	-	-	100.9	0.9	101.9	11.0
50	-	-	101.4	2.0	100.7	0.9	50	-	-	100.4	2.7	101.1	3.8
100	92.0	84.6	101.4	2.3	101.9	1.5	100	92.1	88.0	100.3	2.0	100.3	3.2
500	-	-	102.5	5.2	99.4	0.5	500	-	-	100.3	2.0	100.3	3.2
Nortriptyline	-	-	97.1	4.0	104.0	10.0	Nordiazepam	-	-	101.1	12.1	101.1	14.8
50	-	-	101.4	2.0	101.5	1.0	50	-	-	101.1	3.6	101.5	3.6
100	95.6	81.4	101.4	2.3	101.5	1.0	100	85.5	97.8	101.1	3.7	101.5	1.2
500	-	-	101.4	2.3	101.9	1.5	500	-	-	100.7	2.2	97.2	4.3
Loxoprofen	-	-	101.9	7.1	101.5	11.0	Loxoprofen	-	-	96.6	9.6	98.7	7.4
50	-	-	101.2	3.5	101.3	1.2	50	-	-	101.3	10.3	103.9	7.9
100	89.1	84.8	101.4	2.9	101.9	1.6	100	105.3	78.8	101.2	9.4	103.9	6.4
500	-	-	101.7	3.7	100.5	1.4	500	-	-	100.7	10.3	100.9	10.4
Desipramine	-	-	100.6	4.1	97.3	11.3	Ketoprofen	-	-	101.2	0.9	100.8	1.1
50	-	-	101.1	3.7	100.5	1.4	50	-	-	101.1	0.9	100.8	1.1
100	90.8	82.4	101.1	3.7	100.5	1.4	100	118.0	92.5	101.2	0.9	100.8	1.1
500	-	-	101.1	3.7	100.5	1.4	500	-	-	101.1	0.9	100.8	1.1
Naproxen	-	-	101.1	3.7	100.5	1.4	Naproxen	-	-	99.9	11.5	106.6	8.8
50	-	-	101.1	3.7	100.5	1.4	50	-	-	101.1	0.9	100.8	1.1
100	105.6	71.3	101.1	3.7	100.5	1.4	100	105.6	71.3	101.1	0.9	100.8	1.1
500	-	-	101.1	3.7	100.5	1.4	500	-	-	101.1	0.9	100.8	1.1

Intraday precision analysis was performed on a single day (n = 5).

Interday precision analysis was performed on three consecutive days in triplicates (n = 9).

回収率は溶液の線速度などに影響され、粒子タイプの固相カートリッジでは流速 1mL/min 程度が最適とされているが、血液用のモノリスでは 1mL を 2 分間で通液する 0.5mL/min 程度の流速が最適であった。モノリスは、粒子タイプの固相に比べて背圧が小さいことから、表面との接触機会を上げるには流速を小さくする必要があると推察される。

本方法は、濃縮操作を必要としないため前処理時間が短縮でき、遠心分離器を使用した簡便な操作のため人為的な誤差の抑制が可能となると期待される。ただし、MonoSpin C18-CX では logP の+小さい薬物の保持は弱く、薬物スクリーニングに活用するには HILIC モードでの抽出を組み合わせるなどの工夫が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 3 件)

1. 奈女良 昭, 全血薬物抽出用 MonoSpin C18-CX の開発と事例への応用, 日本法中毒学会第 35 年会, 2016 年 07 月 01 日~2016 年 07 月 02 日, 大阪
2. 奈女良 昭, 全血中薬物抽出用 MonoSpin の開発と中毒事例への応用, 日本法中毒学会第 34 年会, 2015 年 06 月 26 日~2015 年 06 月 27 日, 福岡
3. 奈女良 昭, 血液からの危険ドラッグ抽出に適したモノスピカラムの開発と中毒事例への応用, 第 99 次日本法医学会学術全国集会, 2015 年 06 月 11 日, 高知
4. Akira Namera, Optimization of silica

monolith in MonoSpin for the extraction of drugs in whole blood. The 9th International Symposium on Advances in legal medicine (ISALM). Jpn J Legal Medicine. Jun 17, 2014; 68: p169, Fukuoka, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奈女良 昭 (NAMERA AKIRA)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号: 30284186